

修士論文要旨

ウキクサの花成誘導初期過程に關与する遺伝子群の単離と解析

人間環境科学研究科 環境情報学専攻 応用生物学研究室

学籍番号 901633006 野村 裕也

序論

高等植物の生活環は、栄養生長段階と生殖生長段階の 2 つに大きく分けることができる。栄養生長から生殖生長へ切り換わることは植物の生活環において重要な現象であり、その生長相の移行により、植物は種子を形成して子孫を残すことができる。これまでにモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて、開花期や花器形成能力に異常のある変異体から花成に關連する多くの遺伝子の機能が同定されてきた。これらの研究から、花芽形成機構は主に 3 つの経路からなると考えられている。1 つは、Long-day pathway と呼ばれるもので光周性と深い関わりがあり、花芽誘導されるときに必須な経路である。2 つめは、Gibberellin-dependent pathway と呼ばれるもので、植物ホルモンであるジベレリンの關与する経路である。3 番目は autonomous pathway と呼ばれるもので、春化と密接な關係があり、長日条件下と短日条件下の両方での花芽誘導に關わる経路である。この 3 つの経路が複雑に絡み合い、花芽誘導を引き起こし、花器を形成している。しかし、Long-day pathway において、葉で受けた光シグナルを生長点へと伝達する経路がほとんど解明されていない。この領域はフロリゲンと呼ばれる花芽形成物質が關与していると考えられている部分である。

本研究では、光シグナル (光周性) に依存する Long-day pathway のなかの、特に約一世紀もの長い間謎とされてきた葉における花成誘導の成立 (フロリゲンの生成)、フロリゲンの化学的正体、そして生長点における初期反応系を解明することを目指した。

材料及び方法

1. 植物材料

絶対的長日性植物のイボウキクサ (*Lemna gibba* G3) を使用した。イボウキクサは、花成誘導条件のほとんどが光周性に依存しているため Long-day pathway を早期に解明しやすいこと、植物体の培養や poly(A)⁺RNA の抽出が容易であることなどの理由から本研究で利用した。培養方法として、培地は Hoagland の E-Medium を利用し、条件は 24 時間のインキュベーター内で 8 時間明期 ($25 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)、16 時間暗期の短日条件で生育した。花成誘導条件は、24 時間の連続光 (24 時間明期) で行った。

2. ディファレンシャル・ディスプレイ (D.D.) 法 (図 1)

イボウキクサの短日条件処理区 (SD : 8 時間明+16 時間暗) と花成誘導処理区 (長日条件処理 : 連続光、2 日間 : LD2、7 日間 : LD7) との間で遺伝子発現を比較した。これら 3 処理区から抽出した poly (A)⁺RNA を逆転写反応により cDNA を合成した。その cDNA を [⁻³²P] dATP でラベルし、PCR で増幅させた。その後、Cambrex 社製の Long Ranger^(R)ゲルを用いて PCR サンプルを電気泳動した。その結果をエックス線フィルムに感光させて確認した。発現量に差が見られる cDNA 断片を抽出し、PCR 反応により増幅した。増幅サンプルの一部をアガロースゲルを用いて電気泳動し、DNA 断片の長さを確認した。

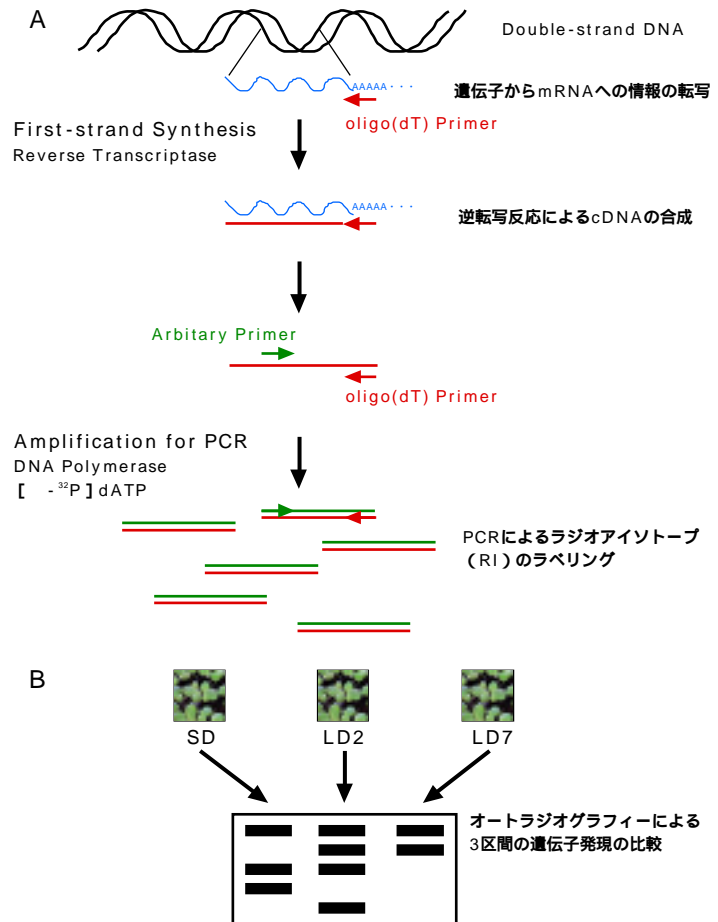


図1 ディファレンシャル・ディスプレイ法のスキーム
A : mRNA のサンプル調整法。DNA から転写された mRNA 量を RI によりラベリングし観察した。
B : ディファレンシャル・ディスプレイの様子。各植物体から抽出した mRNA を A で示した方法で増幅させ、3 区間での mRNA の転写量を比較した。

3. RT-PCR

TaKaRa 社製の RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1 に従い、RT-PCR を行った。PCR 時のプライマーは D.D.法により得られた断片の配列上から作製した。その後、アガロースゲル、あるいは短い断片検出の場合は MetaPhor^(R)アガロースを使用して電気泳動を行い、PCR による増幅の様子を確認した。

4. RACE 法による全長 cDNA の単離 (MarathonTM cDNA Amplification Kit CLONTECH)

LD2 条件のイボウキクサから抽出した poly (A)⁺RNA を使用し、一本鎖 cDNA を合成した。その後、二本鎖 cDNA を合成し、アダプターをライゲーションした。アダプターライゲーション産物をテンプレートとして、5'、3'-RACE PCR を行った。PCR は、アダプター上に作られたプライマーと、D.D.法で単離した断片の配列上から作製したプライマーを使用し、94 °C、30 sec. (94 °C、5 sec. 72 °C、4 min.) 5 cycles (94 °C、5 sec. 70 °C、4 min.) 5 cycles (94 °C、5 sec. 68 °C、4 min.) 25 cycles の条件で行った。その後アガロースゲルを用いて電気泳動し、バンドを確認した。

結果及び考察

イボウキクサは、3日間の長日条件で花成を誘導する。花成誘導初期過程に発現する遺伝子群を調査するために、LD2、LD7条件で生育させた植物体とSD条件で生育させた植物体の poly(A)⁺RNA を抽出し D.D.法で遺伝子の発現を比較した(図1)。その結果、エネルギー代謝・合成関連遺伝子と相同性を持つクローンは10個、既知遺伝子と相同性を持つクローンは6個、未知機能遺伝子と相同性を持つクローン、あるいは全く相同性を持たないクローンは26個であった。既知遺伝子との相同物の中には、イネ(Oryza sativa)やシロイヌナズナに見られる、オーキシンに発現が制御され転写因子として働く Auxin Response Factor (ARF) の DNA binding domain やシグナル伝達に関連すると考えられる GTP-binding protein の一部と高い相同性を示すクローンを確認した。

単離したクローンについて RT-PCR を行い、D.D.での発現パターンを再確認した。28クローンについて RT-PCR を行ったが、そのうち D.D.での発現パターンと同様の結果が得られたのは8クローンのみであった。RT-PCR による再現性の低さの原因は、主に D.D.法での技術的な問題にあると考えられる。それは、D.D.で使用した cDNA 濃度を変えることで、ある程度解決することができた。cDNA 濃度が低いとバンドの比較が困難となり、誤った cDNA 断片を回収する確率が高くなる。RT-PCR での再現率 0%であったのが、cDNA 濃度を高くして D.D.法を行ったところ、再現率は53%に上昇した。他の細かい問題も解決することで、より確実に、効率よく目的の遺伝子を単離できると考えられる。RT-PCR の結果から最終的に3処理区間で発現量に差が見られたのは、全部で18クローンであった。花成誘導に関連すると考えられる cDNA 断片は15クローンであった(表1)。そのうち長日条件で強く発現するクローンは13個見つかった。

表1 ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて単離したクローン

クローンNo.	断片長 ^a	発現パターン(D.D.) ^b			発現パターン(RT-PCR) ^b			ホモロジー ^c
		SD	LD2	LD7	SD	LD2	LD7	
No.3-1	337	-	++	+	++	+	+	unknown protein [Arabidopsis thaliana]-54%
No.5-33	789	-	+	-	+	++	++	GTP-binding protein-like [Arabidopsis thaliana]-75%
No.7-2	593	-	+	-	-	++	+	auxin response factor 8 [Oryza sativa]-70%
No.15-4	442	+	++	-	++	++	+	
No.18-7	681	+	++	+	+	++	++	putative tetracycline transporter protein [Arabidopsis thaliana]-27%
No.29-4	416	-	+	++	-	+	+	putative CER1 [Oryza sativa]-52%
No.33-5	326	-	-	+	-	+	+	
No.34-2	197	-	+	+	+	++	++	
No.35-1	171	+	+	++	+	++	++	
No.38-2	177	-	+	+	-	+	+	unknown protein [Arabidopsis thaliana]-70%
No.44-1	186	-	+	+	+	++	++	
No.49-4	210	+	++	++	+	++	++	
No.51-1	680	-	+	+	-	+	-	
No.52-1	403	-	+	+	-	+	+	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]-46%
No.55-1	271	-	+	++	-	+	+	

a: ディファレンシャル・ディスプレイ法から単離した断片の長さ(bp)。

b: 発現パターンをクローンの処理区間で比較。(-) 発現なし、(+) 発現あり、(++) 強く発現。

c: アミノ酸レベルで最も高い相同性を持つタンパク質を示す。%はアミノ酸配列の一致度。

RT-PCRの結果からLD条件のみで発現が観察されたクローン No.7-2 について、さらに細かい遺伝子発現の様子を、タイムコースをとって確かめた(図 2)。その結果、長日条件に移してから 1 日に発現量が最も上昇し、その後 2 日目に減少し、3 日目には初期の発現量に戻るといふ発現パターンを示した。この発現パターンと D.D.後の RT-PCR の発現パターンとは全く

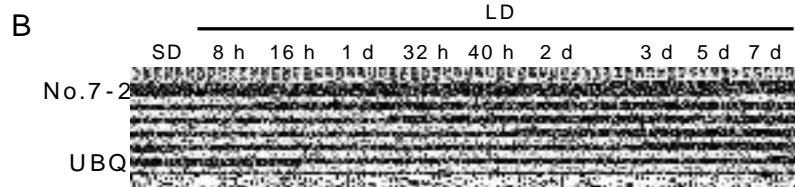


図2 No.7-2のmRNA発現量の時間経過による調査

A : ディファレンシャル・ディスプレイ後のRT-PCR。SD (短日条件で生育/8 h : 明期・16 h : 暗期) でのmRNAの発現は見られなかったが、LD2、LD7 (長日条件に移してから2日後、7日後/連続光) で発現が観察された。プライマーは、ディファレンシャル・ディスプレイで単離したcDNA断片上から作製したものをを用いた。0.05 μgのpoly(A)⁺RNAを使用した。

B : 8時間ごとのmRNAタイムコース実験。上がクローンNo.7-2のRT-PCRの結果。PCR時のプライマーは、Aと同じものを使用した。長日条件へ移してから1日後が最も高く、2日後で発現量が最小となった。0.05 μgのpoly(A)⁺RNAを使用した。下がコントロールとして、シロイヌナズナのユビキチン遺伝子(UBQ)上から作製したプライマーを使用してPCRを行ったときの発現パターンを示した。0.02 μgのpoly(A)⁺RNAを使用した。h : 時間 d : 日数

異なる結果が得られた(図 2)。コントロールとして、恒常的に発現するユビキチン遺伝子(UBQ)の発現パターンを観察したところ、発現の変動が見られなかったことから、タイムコース実験での発現パターンの結果に信頼性があると考えられる。また、この発現パターンには概日リズムが見られないことから、光周性には直接関連しない遺伝子であると推測される。ウキクサ科の植物は光周性に強く依存して花成誘導を引き起こすが、ストレスや窒素欠乏など他の因子によっても引き起こされることが知られている。クローン No.7-2 はそれらに関わる遺伝子である可能性が示唆された。

そして、このクローンの全長cDNAをRACE法により単離し、その配列を解析したところ、イネ(*Oryza sativa*)のARF8と高い相同性を示すことが分かった。ARF8のアミノ酸配列はN末端にDNA binding domain、C末端には二量体化領域が存在し、その間をグルタミンリッチな配列が占め転写を制御している。ARF8は、植物体へのオーキシン処理によって発現が高まる遺伝子として知られている。また、オーキシン自体を植物体に投与すると花成が促進されるという報告がされている。そのことからオーキシンの作用機構は花成にも関連していることが示唆される。クローン No.7-2 のタイムコース実験(図 2)では、誘導条件 1 日目に発現量が上昇し、イボウキクサの花成が誘導され始める 2 日目に最も減少するという発現パターンを示したが、どのようにしてクローン No.7-2 が花成誘導段階に関わっているのかは分からなかった。クローン No.7-2 についてはさらに花成との関連性を調査する必要がある。